

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Jitka Brožová**

Využití metodik molekulární biologie k určení polymorfizmu HLA antigenů  
Application of methods of molecular biology for determination of polymorphism of HLA antigens

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Antonij Slavčev, CSc.

Praha, 2012

### *Poděkování*

Ráda bych poděkovala mému školiteli MUDr. Antoniji Slavčevovi, CSc. za jeho velkou vstřícnost, trpělivost a odborné rady. Dále děkuji Mgr. Liboru Kolesárovi za cenné poznámky k mé práci a všem mým blízkým, rodině i přátelům za neustálou podporu při psaní bakalářské práce.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2012

## **Abstrakt**

Komplex HLA (Human leukocyte antigen) je rozsáhlý genový úsek nacházející se na krátkém raménku chromozomu 6. Skládá se ze tří regionů, I. a II. region kódují geny HLA I. a II. třídy, ve III. regionu se nacházejí geny komplementu, TNF $\alpha$  a další geny, které nejsou evolučně a funkčně spojeny s geny HLA. HLA geny I. a II. třídy kódují povrchové glykoproteiny, které ve svém vazebném místě prezentují peptidy buňkám imunitního systému. HLA geny jsou spojovány s mnoha autoimunitními a infekčními nemocemi, i když mechanismy těchto asociací jsou většinou zatím neznámé. HLA fungují jako silné transplantací antigeny, tudíž představují velkou překážku při alogenních orgánových transplantacích a transplantacích krvetvorných buněk. K zabránění rejekce transplantovaného orgánu, je nezbytné, aby se tkáň dárce shodovala v HLA genech tkáň příjemce. Určení shody dárce s příjemcem je prováděno pomocí HLA typizačních technik. HLA typizace se dnes ve většině laboratoří v Evropě a USA výlučně provádí metodami molekulární biologie. Mezi tyto metody řadíme tři hlavní techniky založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), PCR se sekvenčně specifickými primery, PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami a sekvenování. Metody molekulární biologie jsou přesnější, citlivější a mají větší rozlišovací schopnost než metody serologické. Proto také takřka zcela nahradily původní typizační techniku, sérologii.

**Klíčová slova:** HLA (Human Leukocyte Antigen), HLA I. třídy, HLA II. třídy, HLA typizace, sérologie, PCR, PCR-SSP, PCR-SSOP, PCR-SBT

## **Abstract**

HLA (Human Leukocyte Antigen) is a gene segment localized on the short arm of chromosome 6. This segment consists of three regions, I. and II. region encode HLA class I and HLA class II genes, in the III. region there are the complement genes, TNF $\alpha$  and other genes that are not evolutionary and functionally associated with HLA genes. HLA class I and class II genes encode cell-surface glycoproteins which in their binding sites present peptides to cells of the immune system. HLA genes are associated with many autoimmune and infectious diseases, although mostly the mechanisms of these associations remain unclear. HLA function as strong transplantation antigens, thus they represent a major obstacle in allogeneic organ transplantation and transplantation of hematopoietic cells. To prevent rejection of the transplanted organ, a match between the recipient and donor in the HLA antigens is necessary. Determination of donor and recipient matching is performed by HLA typing techniques. Nowadays for HLA typing in most laboratories in Europe and the USA are used methods of molecular biology. Among these methods, three main techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) are applied, these are PCR-sequence-specific primers, PCR-sequence-specific oligonucleotide probes and PCR-sequencing-based typing. Methods of molecular biology are more specific, more sensitive and they have greater resolution capacity. Therefore these methods almost completely have replaced the original serological typing techniques.

**Key words:** HLA (Human Leucocyte Antigen), HLA class I, HLA class II, HLA typing, serology, PCR, PCR-SSP, PCR-SSO, PCR-SBT

## Obsah

1	Úvod .....	2
2	HLA antigeny a jejich charakteristika.....	3
2.1	HLA antigeny I. třídy .....	4
2.1.1	Klasické HLA I. třídy .....	4
2.1.2	Neklasické HLA I. třídy .....	5
2.2	HLA antigeny II. třídy .....	6
2.3	Zpracování a prezentace antigenu .....	6
2.4	III. region histokompatibilního komplexu.....	8
2.5	HLA polymorfismus a nomenklatura.....	8
2.6	Poruchy exprese HLA molekul I. a II. třídy .....	9
3	Metody HLA typizace .....	10
3.1	Sérologie.....	10
3.2	HLA typizace s použitím metodik molekulární biologie .....	11
3.2.1	Extrakce DNA .....	11
3.2.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	12
3.2.3	PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP) .....	16
3.2.4	PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP)..	16
3.2.5	Luminex.....	18
3.2.6	Sekvenování HLA genů (sequencing-based typing, SBT).....	19
4	Závěr.....	21
5	Literatura .....	22

# 1 Úvod

Hlavní histokompatibilní komplex (MHC, Major histocompatibility complex) je genový úsek nacházející se na krátkém raménku chromozomu 6, obsahuje více než 3600 kbp a vyznačuje se svým obrovským polymorfismem. U člověka je tento komplex nazýván HLA (Human leukocyte antigens) a obsahuje více než 200 genů (Klein & Sato, 2000). HLA systém obsahuje 3 regiony, HLA I., II. a III.. Jeho hlavní funkce souvisí s regulací imunitní odpovědi, na níž se podílejí jen HLA geny I. a II. třídy kódující povrchové glykoproteiny, které mají za úkol prezentovat ve svých kapsách peptidy CD4<sup>+</sup> a CD8<sup>+</sup> T-lymfocytům (Vandiedonck & Knight, 2009).

Výzkum HLA komplexu započal před více než 50 lety při studiu alogenních transplantací a bylo zjištěno, že HLA jsou silné transplantační antigeny. Představují tedy překážku při alogenních orgánových transplantacích a transplantacích krvetvorných buněk. Transplantovaná tkáň dárce musí být histokompatibilní s tkání příjemce. Pokud se HLA antigeny dárce orgánů shodují s HLA antigeny příjemce, tak funkce a přežití transplantovaných orgánů jsou výrazně lepší, než když se HLA antigeny neshodují (Trivedi et al., 2007). V případě transplantace kmenových buněk, shoda v HLA systému má životně důležitý význam pro úspěch transplantace. Dnes už víme, že význam HLA komplexu je mnohem rozsáhlejší, jak v imunologii, tak v medicíně (Wassmuth, 2010). Geny HLA komplexu jsou spojeny s incidencí mnoha autoimunitních a infekčních nemocí. I když jsou asociace HLA molekul s autoimunitními chorobami dlouho známé, dosud patogenetické mechanismy těchto asociací zůstávají pro většinu z nich nejasné. (Caillat-Zucman, 2009).

HLA typizace je nezbytná při transplantacích k určení shody dárce s příjemcem. Význam využití HLA typizace byl prokázán i v antropologii, v soudních sporech o otcovství atd. (Trivedi et al., 2007). Metody typizace HLA jsou různé. Jako první byla používána sérologie, ale v současné době je prakticky úplně nahrazena metodami molekulární biologie, na které se v mé práci zaměřím. Nejpoužívanější z těchto metod jsou techniky odvozené od polymerázové řetězové reakce (PCR), mezi které patří PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-sequence-specific primer, PCR-SSP), PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-sequence-specific oligonukleotide probes, PCR-SSOP) a sekvenování (PCR-sequencing-based typing, PCR-SBT). Jako nejnovější rychle se rozvíjející, velmi efektivní a spolehlivá metoda je Next-generation sequencing (NGS) (Dunn, 2011).

Cíle této práce jsou:

1. Na základě dostupné literatury stručně shrnout poznatky o lidských leukocytárních antigenech (HLA).
2. Zpracovat dostupnou literaturu a informace týkající se metod molekulární biologie pro typizaci HLA genů, zejména metody odvozené od PCR (PCR-SSP, PCR-SSOP, PCR-SBT).

## 2 HLA antigeny a jejich charakteristika

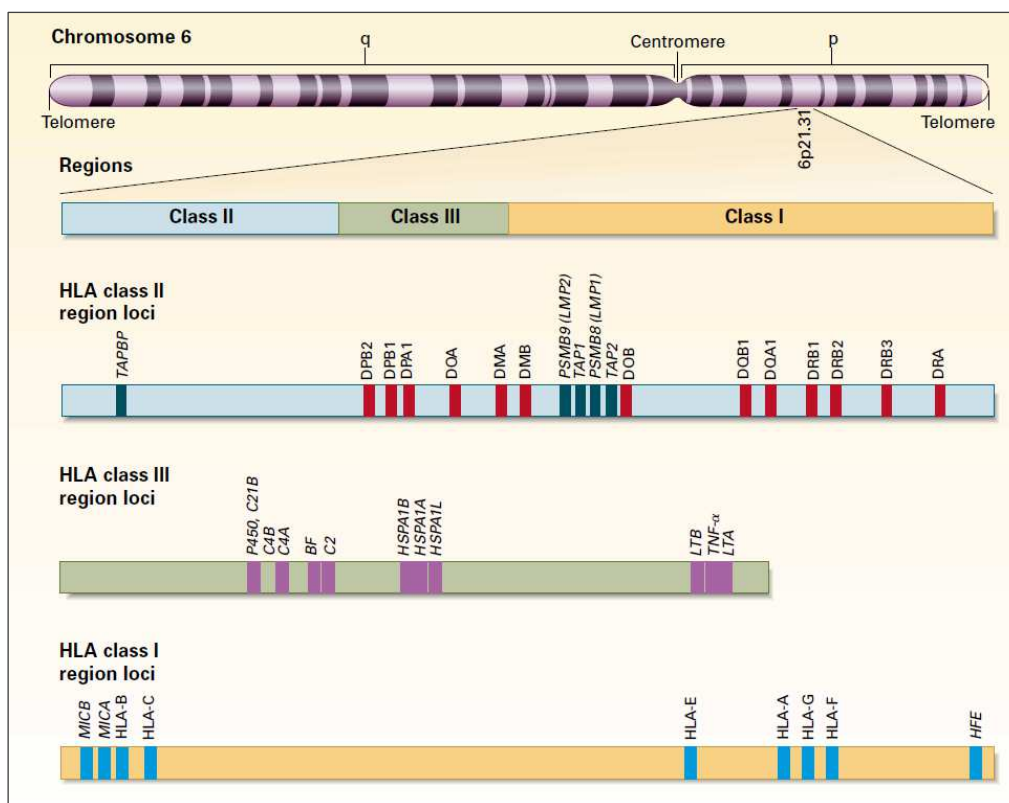
HLA systém se nachází na krátkém rameni chromozomu 6 v pozici 21.31 (6p21.31) (viz Obr. 1). Tento segment je vysoce polymorfní, nejvíce v celém lidském genomu a jak bylo uvedeno výše, přibližně 4 Mbp dlouhý. Celý komplex se skládá z 224 genů, z nichž 128 genů je exprimováno a zbývajících 96 pseudogenů (Yuhki et al., 2007).

HLA komplex je rozdělen na 3 regiony (HLA I., II, a III. třídy). Oblast HLA I. třídy, nacházející se na telomerickém konci, obsahuje klasické geny HLA-A, HLA-B a HLA-C a také neklasické geny HLA-E, HLA-F a HLA-G. Oblast HLA II. třídy poblíž centromery se skládá ze tří hlavních genových rodin HLA- DP, HLA-DR a HLA-DQ. Oblast HLA III. třídy obsahuje geny, které nejsou evolučně příbuzné s HLA geny. Jsou to například geny pro některé složky komplementu (C2, C4, faktor B), 21-hydroxylasu, faktor nekrotizující nádory (TNF) a další (Choo, 2007).

Pouze regiony HLA genů I. a II. třídy (přibližně 40 % všech exprimovaných genů) kódují povrchové glykoproteiny, které se účastní regulace imunitní odpovědi organismu. Tyto glykoproteiny s navázaným peptidovým fragmentem vytvářejí komplexy peptid-HLA, na které se specificky váží receptory T-lymfocytů. HLA molekuly I. třídy se vyskytují na všech jaderných buňkách a ve většině případů prezentují endogenní nebo virové peptidy, kdežto HLA molekuly II. třídy se nacházejí jen na antigen-prezentujících buňkách (APC- dendritické buňky, makrofágy, B-lymfocyty a folikulární dendritické buňky), ty naopak prezentují peptidy pocházející z exogenních proteinů (Klein & Sato, 2000).

Úspěšnost transplantace orgánů závisí (kromě klinických faktorů) na co největší shodě v hlavních transplantačních antigenech, což jsou HLA-A, HLA-B a HLA-DR. Antigen-prezentující buňky (APC) dárce, ale i příjemce mohou aktivovat T-lymfocyty příjemce. APC dárce přítomné ve štěpu vyvolávají přímou aktivaci T-lymfocytů příjemce. APC příjemce mohou získat aloantigeny ze štěpu a prezentovat je pomocným T-lymfocytům příjemce

a vyvolat tak nepřímou aktivaci, která hraje významnou roli při pozdní chronické rejekci na rozdíl od přímé aktivace, která naopak zastává důležitou úlohu při akutní rejekci (Choo, 2007).



Obr. 1: Schématické znázornění HLA komplexu na chromozomu 6 (převzato z Klein & Sato, 2000)

## 2.1 HLA antigeny I. třídy

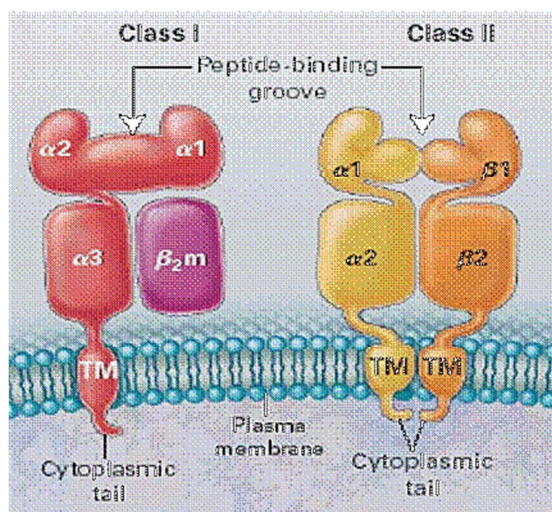
HLA antigeny I. třídy jsou kódovány klasickými a neklasickými geny. Klasické HLA geny mají tři lokusy HLA-A, HLA-B a HLA-C. Do neklasických HLA genů I. třídy jsou zařazovány lokusy HLA-E, HLA-G a HLA-F (Veiga-Castelli et al., 2011).

### 2.1.1 Klasické HLA I. třídy

HLA antigeny I. třídy, mezi které patří HLA-A, HLA-B a HLA-C, se skládají z  $\alpha$ -řetězce a  $\beta_2$ -mikroglobulinu. Tento gen je kódován na chromozomu 15 oproti  $\alpha$ -řetězci, který je kódován právě geny I. třídy. Velikost  $\alpha$ -řetězce je 45 kDa a skládá se ze třech extracelulárních domén ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ), transmembránové oblasti a intracelulární domény (viz Obr. 2).  $\beta_2$ -mikroglobulin a  $\alpha 3$  domény spolu tvoří konstantní imunoglobulinu podobnou doménu. Domény  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$  obsahují variabilní sekvenci aminokyselin a je zde vazebné místo



(žlábek), které na sebe váže zpracované peptidy o velikosti 8-10 aminokyselinových zbytků (Choo, 2007).



Obr. 2: Struktura molekul HLA I. třídy a HLA II. třídy (převzato z Klein & Sato, 2000)

### 2.1.2 Neklasické HLA I. třídy

Na rozdíl od klasických HLA molekul I. třídy mají neklasické molekuly nižší polymorfismus, omezený výskyt v tkáních a odlišnou funkci. Jedná se o HLA-E, HLA-F a HLA-G. Stejně jako klasické molekuly tvoří komplex s  $\beta 2$ -mikroglobulinem a mohou tak prezentovat peptidy na buněčném povrchu, ale není to jejich hlavní funkcí (Veiga-Castelli et al., 2012). HLA-G je primárně exprimován na rozhraní matka-plod na povrchu buněk trofoblastu, kde zastává úlohu v ochraně plodu před imunitní odpovědí matky. Rozmanitost peptidů navázaných na HLA-G je omezená vzhledem ke klasickým HLA molekul I. třídy, je ale širší ve srovnání s HLA-E (Clements et al., 2005). HLA-G je také nacházen v dalších tkáních lidského těla: rohovka, dřev brzlíku, nezralé erytrocyty a slinivka. Exprese HLA-G je buď zvyšována, nebo snižována v řadě patologických stavů jako jsou: rakovina, autoimunitní onemocnění a virové infekce (Favier et al., 2007). HLA-E na rozdíl od HLA-G je exprimován ve všech buňkách i tkáních a je to nejméně polymorfní HLA gen I. třídy. HLA-E hraje roli v nespecifické imunitě pomocí interakce s receptorem CD94-NKG2A na povrchu NK buněk (natural killer cell), čímž způsobí změnu jejich aktivity a jako antigen prezentující molekula spouští specifickou imunitní odpověď (Veiga-Castelli et al., 2012). HLA-F můžeme nalézt na mandlích, slezině, tkáni brzlíku a placentě (Lepin et al., 2000).

## 2.2 HLA antigeny II. třídy

Mezi antigeny HLA II. třídy jsou zařazovány HLA-DR, HLA-DP a HLA-DQ. HLA molekuly II. třídy se skládají z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce (30 kDa), které jsou kódovány geny A a B. Genová rodina DR je složena z genu DRA ( $\alpha$ -řetězec rodiny R) a až devíti DRB genů ( $\beta$ -řetězec rodiny R). Produkty genů DQA a DQB utvářejí DQ molekuly a stejně tak DPA a DPB utvářejí DP molekuly (Choo, 2007). Oba řetězce  $\alpha$  a  $\beta$  mají stejnou strukturu a každý z nich má čtyři domény: peptid vázající doménu ( $\alpha 1$  a  $\beta 1$ ), imunoglobulinu podobnou doménu ( $\alpha 2$  a  $\beta 2$ ), transmembránovou oblast a cytoplazmatický ocas (viz Obr. 2). Žlábek, který váže antigen (peptid vázající doména) má oba konce více otevřené, než je tomu u molekul I. třídy a tudíž se do tohoto vazebného místa mohou navázat delší peptidy, které mají 12-35 aminokyselinových zbytků (Klein & Sato, 2000).

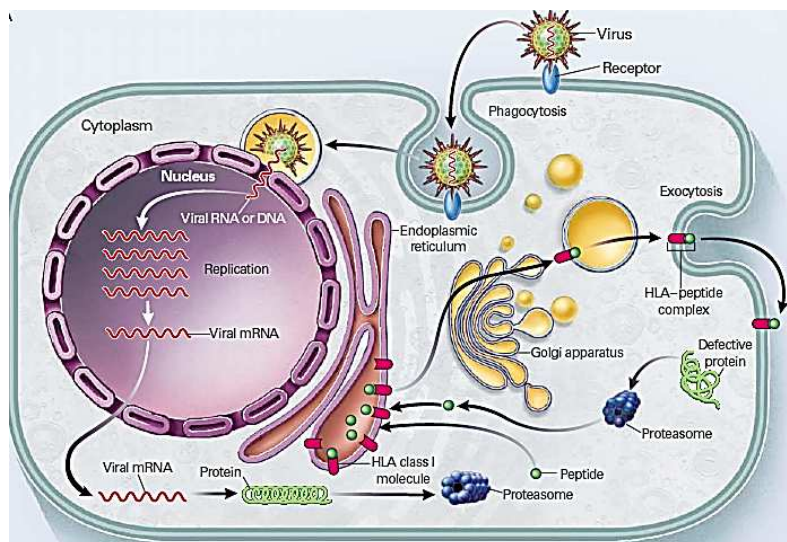
## 2.3 Zpracování a prezentace antigenu

Zásadním bodem pro správnou funkci molekul HLA I. a II. třídy je řádné složení polypeptidových řetězců a navázání peptidu ve správnou chvíli. Antigeny HLA I. třídy prezentují peptidy CD8<sup>+</sup> T lymfocytům na všech jaderných buňkách v těle a obvykle navazují do svého vazebného místa endogenní peptidy (pocházející z poškozených buněčných proteinů a peptidů virového původu), ale v některých případech prezentují i exogenní peptidy (zkřížená prezentace). Antigeny HLA II. třídy se vyskytují jen na B lymfocytech, makrofázích, dendritických buňkách a folikulárních dendritických buňkách, kde prezentují zpracované exogenní peptidy CD4<sup>+</sup> T lymfocytům (bakteriální peptidy) (Germain, 1995).

Polypeptidové řetězce I. třídy ( $\alpha$  a  $\beta_2$ -mikroglobulin) jsou vyráběny odděleně na povrchu endoplasmatického retikula (ER). Tyto řetězce se za pomoci několika molekulárních chaperonů správně sbalí v lumen ER a čekají na navázání peptidu. Peptidy nacházející se v cytoplazmě jsou zde degradovány proteazómem. Poté jsou za pomoci TAP<sup>1</sup> (TAP1 a TAP2) molekul přesunuty do lumenu ER, kde se naváží na molekuly I. třídy. Dále se molekula s navázaným peptidem přes Golgiho aparát dostane na buněčný povrch pomocí exocytózy (Klein & Sato, 2000).

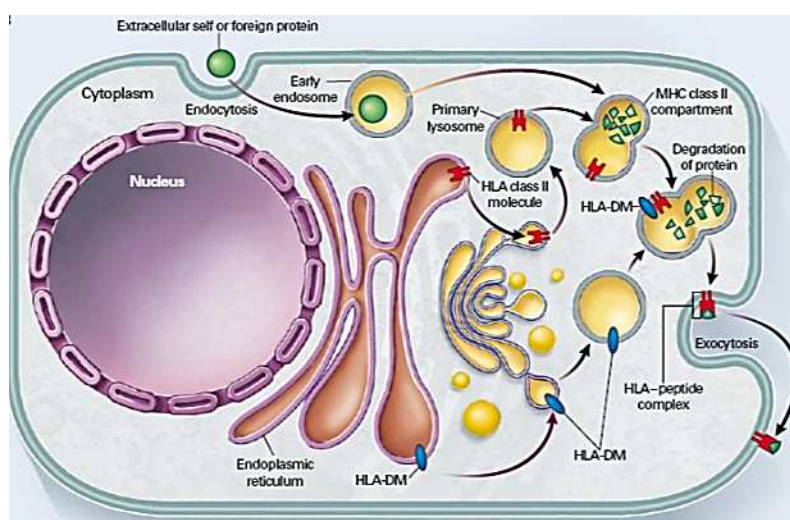
---

<sup>1</sup> TAP = transporter associated with antigen processing; transportéry spojené se zpracováním antigenu, kódovány geny TAP1 a TAP2



Obr. 3: Prezentace peptidu molekulami HLA I. Třídy (převzato a upraveno z Klein & Sato, 2000)

Řetězce molekul II. třídy jsou obdobně vyráběny na povrchu ER, ale na rozdíl od I. třídy není peptid navázán v ER, ale na jeho místo je navázán invariantní řetězec, který brání předčasnému nasednutí peptidu. Vzniklá molekula HLA II. třídy s navázaným invariantním řetězcem je nesena ve vezikulu (primární lysozym) z Golgiho aparátu do cytoplazmy, kde se setká s endozomem, který nese endocytovaný peptid. Poté spolu endozom a vezikula splynou a tím vznikne kompartment HLA II. třídy, kde dojde k degradaci exogenního proteinu a převážné části invariantního řetězce účinkem proteáz. Stále však určitá zbývající část invariantního řetězce blokuje vazebné místo a to musí být uvolněno pro navázání peptidu a k tomuto účelu slouží molekula HLA-DM. Poté je zpracovaný peptid navázán do žlábků a celá molekula II. třídy je, stejně jako v případě molekul I. třídy, exocytována na buněčný povrch (Klein & Sato, 2000).



Obr. 4: Prezentace peptidu molekulami HLA II. Třídy (převzato a upraveno z Klein & Sato, 2000)

## 2.4 III. region histokompatibilního komplexu

III. region obsahuje 61 genů, zahrnuje přibližně 700 kb a v lidském genomu má tato oblast největší genovou hustotu. Pojmenování těchto genů není podle jejich funkce, ale je založené na faktu, že leží mezi oblastí HLA I. a II. třídy. V tomto regionu se vyskytuje oblast, kterou můžeme nazývat „zánětlivou“ oblastí. Tyto geny se účastní zánětlivé odpovědi a obsahují členy cytokinové rodiny faktor nekrotizující nádory (TNF) (Deakin et al., 2006).

Jak jsme se už zmínili, v této třídě se nacházejí geny kódující proteiny s různými funkcemi, jako například geny pro některé složky komplementu (C2, C4, faktor B), 21-hydroxylázu, faktor nekrotizující nádory (TNF). Téměř u poloviny proteinů III. třídy není známá jejich funkce, avšak některé tyto geny obsahují specifické domény, které nám mohou napovědět jejich možnou funkci. Několik málo genů hraje určitou úlohu v nespecifické imunitě – složky komplementu (C2, C4, faktor B) a rodina faktorů nekrotizující nádory (TNF, LTA, LTB). Další skupina genů se podílí na interakcích s DNA a RNA – např. MSH5 (párování chromozómů při meióze), LSM2 (sestřih pre-mRNA), VARS2 (aminoacyl tRNA syntetáza). Zbývající geny zahrnují různorodou směs metabolických enzymů, transkripčních faktorů a podobné proteiny (Xie et al., 2003).

## 2.5 HLA polymorfismus a nomenklatura

HLA systém je nejvíce polymorfním genovým úsekem v lidském těle. Předpokládá se, že rozložení a frekvence HLA genů je odlišné napříč všemi etnickými skupinami z důvodu selektivního tlaku v různých zeměpisných oblastech (Choo, 2007). Polymorfní oblasti jsou u HLA I. třídy lokalizovány v doménách  $\alpha 1$  a  $\alpha 2$ , které tvoří vazebné místo pro peptid. Tyto domény jsou kódovány exony 2 a 3 (Hoelsch et al., 2005). HLA geny II. třídy mají prakticky veškerý svůj polymorfismus umístěn v genu pro  $\beta$ -řetězec (DRB gen) na exonu 2 ( $\alpha 1$ -doména), zatímco gen DRA je velmi málo polymorfní; geny DQA a DPA rovněž vykazují nízkou úroveň polymorfismu (Tiercy, 2002). Výše zmíněné domény tvoří vazebné místo pro peptid (žlábek). Různé variace aminokyselin v této oblasti mohou nepatrně pozměnit tvar žlábků a tím změnit specifičnost HLA molekuly (Choo, 2007).

Pojmenování a zařazení všech HLA alel a antigenů náleží Výboru pro nomenklaturu faktorů HLA systému, který spadá pod Světovou zdravotnickou organizaci (WHO). Název alely se může skládat ze 4, 6 nebo 8 číslic v závislosti na její sekvenci. První dvě čísla označují alelovou skupinu, třetí a čtvrtá číslice určují pořadí, ve kterém byla sekvence určena. Alely, u kterých se první čtyři číslice liší, se musí lišit i v jedné nebo více nukleotidových

substitucích, které pozmění aminokyselinovou sekvenci kódovaného proteinu. Alely, u kterých je pouze v kódující sekvenci synonymní nukleotidová substituce, se označují pátou a šestou číslicí. Sedmou a osmou číslicí se označují alely, které se liší sekvenčním polymorfismem v intronech nebo v 5' a 3' nepřekládaných oblastech sousedících s exony a introny. Postupem času se stále rostoucím počtem popsanych alel bylo rozhodnuto o zavedení dvojtečky mezi číslicemi, které slouží jako oddělovače samostatných polí (např. A\*01:01:01:01) (Marsh et al., 2010). Centralizované úložiště pro sekvence alel pojmenovaných Výborem pro nomenklaturu faktorů HLA systému poskytuje IMGT/HLA databáze (Robinson et al., 2003).

## **2.6 Poruchy exprese HLA molekul I. a II. třídy**

Nejzávažnější porucha HLA molekul nastává v případě, když exprese genů je z nějakého důvodu snížena anebo úplně zastavena. Následkem je nízký počet HLA molekul I. a II. třídy na povrchu lymfocytů, tato porucha se nazývá syndrom holých lymfocytů. Je zajímavé, že není způsobena vadou genů I. a II. třídy, ale vadami v jiných genech, které ovlivňují expresi molekul HLA na povrchu buněk (Klein & Sato, 2000).

Syndrom holých lymfocytů je termín používaný k popisu poruch, které vedou k selhání exprese HLA antigenů I. nebo II. třídy anebo obou zároveň. Pokud T-lymfocyty nejsou schopné rozpoznávat antigeny prezentované HLA molekulami, má to za příčinu absenci buněčné i humorální odpovědi. V takovém případě je lidské tělo velmi citlivé na virové, bakteriální a plísňové infekce. Už od raného dětství napadají infekce hlavně dýchací cesty a trávicí trakt, které mohou vést až k úmrtí. Jedinou efektivní léčbou je transplantace kostní dřeně (Klein et al., 1993).

Porucha HLA molekul I. třídy může být způsobena i nefunkčností heterodimeru TAP, který transportuje zpracované peptidy na molekuly I. třídy. Jedná se o chybu v genu TAP1 nebo TAP2. Pokud chybí alespoň jedna z těchto podjednotek, nedochází k navázání peptidu na molekulu I. třídy a ta se stává nestabilní. Počet molekul na buněčném povrchu klesne téměř k 1% normální úrovni. Následek tohoto snížení se objevuje v pozdním dětství v podobě chronických bakteriálních infekcí dýchacího ústrojí, postupnou degradací plicní tkáně a bronchiectázie, což vede k nedostatečné funkci dýchacího ústrojí. Poruchy HLA II. třídy jsou ve většině případů zapříčiněny defekty v genech, které regulují transkripci u genů II. třídy (Klein & Sato, 2000).

### 3 Metody HLA typizace

Hlavním účelem HLA typizace je posouzení shody dárce s příjemcem při transplantacích, ale je hojně využívána i v ostatních odvětvích medicíny, například v asociačních studiích s různými chorobami, antropologii atd. Historicky první metodou typizace byla sérologie, která byla postupem času vystřídána metodami molekulární biologie (Trivedi et al., 2007).

#### 3.1 Sérologie

Sérologie byla dříve nepostradatelná typizační metoda HLA antigenů. V současné době je prakticky zcela nahrazena molekulárními technikami, které jsou mnohem vhodnější pro HLA typizaci, což bylo prokázáno i ve studii, kde byla porovnávána úspěšnost sérologie a molekulární metody PCR-SSP při HLA typizaci (Mishra et al., 2004). Pomocí sérologie bylo všech šest HLA antigenů identifikováno pouze u 40 % pacientů s maximem neurčených antigenů při DR typizaci. Při použití PCR-SSP bylo identifikováno téměř 90 % všech alel. HLA typizace PCR-SSP je rychlá, přesná, technologicky jednoduchá a ekonomičtější metoda než sérologie (Mishra et al., 2004).

Sérologické techniky jsou závislé na preparaci k získání živých lymfocytů (v případě HLA typizace II. třídy jsou zapotřebí B-lymfocyty) a na dostupnosti vhodného antiséra k rozeznání HLA antigenů (Middelton, 2005). Nejznámější sérologickou metodou byla donedávna na komplementu závislá sérologie. HLA antisérum je získáváno většinou z vícerodiček. Tato antiséra obsahují protilátky k HLA antigenům a ty váží cílové antigeny na povrchu lymfocytů. Takto vytvořený komplex antigen-protilátka aktivuje klasickou cestu komplementu, což vede k lyzi buněk. Lyze může být detekována vstupem barviva do mrtvých buněk. K rozlišení živých a mrtvých buněk může být použit mikroskop s fázovým kontrastem anebo fluorescenční mikroskop. Mrtvé buňky jsou větší a světlejší než živé, jejich membrány nejsou dobře ohraničené, živé buňky jsou menší a jejich membrány jsou jasně viditelné.

Pro HLA typizaci jsou nejvhodnější zdroje lymfocytů slezina, lymfatické uzliny a periferní krev. Použití sleziny a periferní krve vyžaduje odstranění červených krvinek prostřednictvím gradientové centrifugace. Kromě červených krvinek musí být odstraněny i krevní destičky, které obsahují HLA antigeny I. třídy a mohou tak způsobovat falešně-negativní reakci adsorpcí protilátek. Krevní destičky mohou být odstraněny například použitím pomalé centrifugace ihned po gradientové centrifugaci. Lymfocyty z lymfatické

uzliny vypláchneme pomocí jehly a stříkačky. Po upravení koncentrace těchto buněk je můžeme použít k typizaci tkáně (Vaughan, 2001).

## **3.2 HLA typizace s použitím metodik molekulární biologie**

Výsledky dalších studií prokazují, že metody založené na DNA mají větší citlivost, rozlišovací schopnost a jsou přesnější než sérologické typizační metody. Při DNA typizacích nedochází k tolika chybám jako při sérologii (Adib et al., 2004).

### **3.2.1 Extrakce DNA**

Izolace DNA je zásadním krokem ještě před samotnou typizací. DNA je získávána z jaderných buněk různými metodami. Jako výchozí materiál pro DNA typizaci HLA systému (genotypizaci) nám slouží: nesrážlivá krev, izolované buňky, buněčné frakce nebo tkáně (lymfatické uzliny, slezina). Jednotlivé kroky izolace zahrnují tři hlavní procedury: 1. zpracování nebo denaturace proteinů, 2. separace DNA a 3. sražení DNA.

Kroky izolace se mohou odlišovat na základě požadovaného objemu, množství buněk, typu získané DNA (jednořetězcová, dvouřetězcová) a čistotě izolace. Množství a kvalitu DNA stanovujeme spektrofotometricky ( $\lambda_{\max}=260$  nm). Poměr naměřených hodnot při 280 nm a 260 nm ukazuje míru kontaminace proteinem. Mezi nevýhody spektrofotometrických metod patří jejich špatná citlivost a nemožnost rozlišit jednořetězcovou (ss) od dvouřetězcové (ds) DNA. Ke zviditelnění rozdílu mezi ssDNA a dsDNA může být použito fluorescenční barvivo (např. SYBR green), které se naváže jen na dsDNA. Výsledný komplex DNA-barvivo absorbuje modré světlo ( $\lambda_{\max}=448$  nm) a emituje zelené světlo ( $\lambda_{\max}=522$  nm).

Velmi populární metodou preparace DNA se stala metoda vysolování, ale v současnosti je téměř nahrazena jinými metodami, které jsou mnohem méně časově náročné. Tato metoda zahrnuje vysolování buněčných proteinů dehydratací a sražením s nasyceným roztokem NaCl. Z nesrážlivé krve jsou získány jaderné buňky (tzv. buffy coats), které jsou smíchány s lyzačním pufrům a lyzát těchto buněk je přes noc inkubován s roztokem proteázy K. Naštěpené proteiny jsou sraženy přidáním 6M nasyceného roztoku NaCl. Následuje centrifugace, poté je sražený proteinový pelet ponechán na dně a supernatant obsahující DNA je převeden do další zkumavky. Pomocí etanolu je vysrážena všechna DNA a poté jsou sražené řetězce DNA přemístěny do TE pufru (Miller et al., 1988).

Velmi často používanými metodami separace DNA jsou magnetická a kolonková metoda s použitím komerčních setů (např. od společnosti QIAGEN). Kolonková metoda

se používá pro purifikaci až 12 µg genomové, mitochondriální, nebo virové DNA z krve a ostatních tělních tekutin. Vzorky jsou zpracovávány buď centrifugací, nebo vakuovou procedurou. DNA se váže na silikagelovou membránu a ostatní znečišťující látky projdou skrz. PCR inhibitory, jako jsou dvojmocné kationty a proteiny jsou zcela odstraněny ve dvou krocích. Čistá nukleová kyselina se vymývá buď vodou, nebo puforem. Získaná DNA je vhodná pro PCR a blottingové procedury. Optimalizované pufrы lyzují vzorky, stabilizují nukleové kyseliny a zvyšují selektivní DNA adsorpci na speciální membránu. Je přidán alkohol a kolonka se naplní lyzátem. Pomocí promývacích pufrů se odstraní nečistoty a čistá DNA je poté vymytá ve vodě nebo v pufru s nízkým obsahem solí. Celý proces trvá pouhých dvacet minut. Na rozdíl od centrifugace je vakuová procedura rychlejší a vhodnější pro DNA purifikaci, kde se kolonky umístí na speciální přístroj (Qiagen, 2010).

Druhá metoda s použitím magnetických kuliček nám poskytuje vysoce kvalitní DNA, vhodnou pro přímé užití v PCR, SNP genotypizaci a sekvenování. Optimalizovaný pufr lyzuje vzorky a DNA se váže na silikonový povrch magnetických kuliček v přítomnosti chaotropních solí. Poté je DNA vázaná na magnetických kuličkách účinně promyta s použitím dvou odlišných promývacích pufrů a následným rychlým propláchnutím destilovanou vodou, která značně zlepšuje čistotu DNA. Touto metodou můžeme získat až 11 µg DNA z celkového objemu vzorku 350 µl (Qiagen, 2010).

DNA může být uskladněna po krátkou dobu při pokojové teplotě (popřípadě v lednici), avšak pokud chceme DNA zachovat měsíce až roky, nejvhodnější teplota uskladnění je od -20 °C do -70 °C (Wassmuth, 2010).

### **3.2.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce je enzymatická amplifikační metoda *in vitro* sloužící pro mnohonásobnou amplifikaci vymezené cílové DNA sekvence. Tato reakce se skládá ze třech po sobě jdoucích kroků, které dohromady tvoří jeden cyklus, který se může až 40x opakovat. Konečným výsledkem je amplifikace vybrané cílové sekvence DNA až v milionech kopií. Nově nasyntetizované DNA řetězce v předchozích cyklech se chovají jako templáty pro další DNA syntézu v následujících cyklech (Strachan & Read, 1999). Produkt amplifikace může být detekován gelovou elektroforézou (např. na 2% agarózovém gelu). PCR je základem všech běžných metod HLA genotypizace (Wassmuth, 2010).

Zahájení syntézy nových DNA řetězců, které jsou komplementární k jednotlivým DNA řetězcům cílové DNA sekvence, se děje za přítomnosti vhodné termostabilní DNA



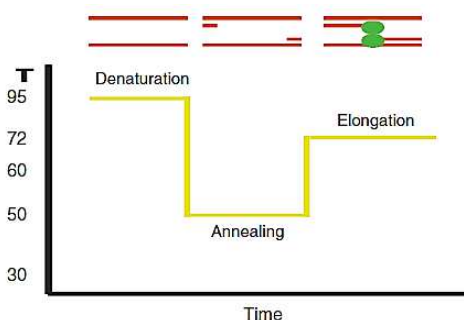
polymerázy. Nejvíce rozšířenou je Taq DNA polymeráza, která pochází z termofilní bakterie *Thermophilus aquaticus*. Přirozeným místem výskytu této bakterie jsou horké prameny (Strachan & Read, 1999).

Mezi základní komponenty polymerázové řetězové reakce patří:

- templátová DNA
- deoxynukleosid trifosfáty (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) – DNA prekurzory (stavební prvky)
- dvojice primerů
- dvojmocné kationty – nejčastěji hořečnaté kationty ( $Mg^{2+}$ ) a manganaté kationty ( $Mn^{2+}$ )
- draslíkové ionty (KCl)
- termostabilní DNA polymeráza (např. Taq polymeráza)
- PCR pufr – specifický pro každou termostabilní polymerázu (např. Tris-HCl); iontová síla nastavena pomocí KCl nebo jiných solí (Innis et al., 1990)

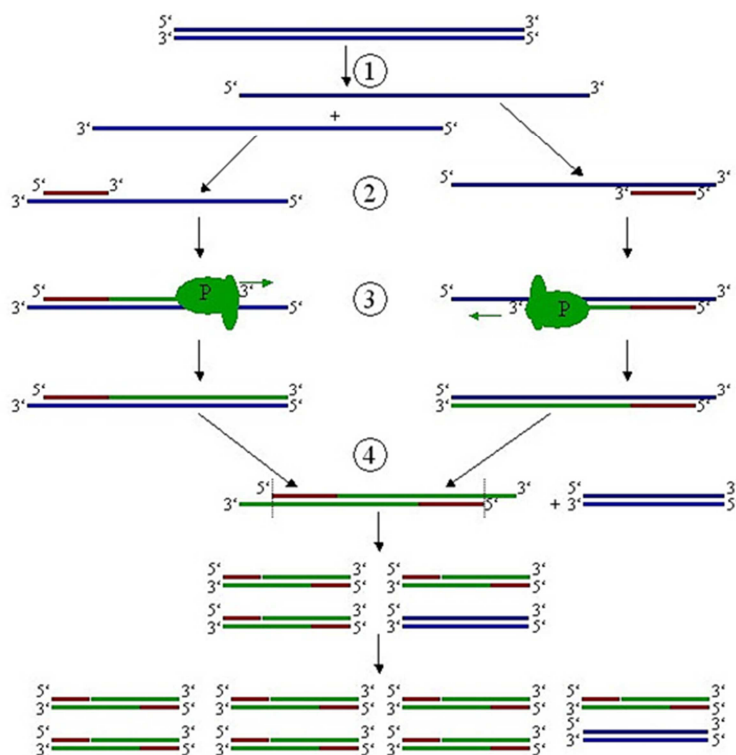
PCR cyklus se skládá ze tří kroků (viz Obr. 6):

- 1) Separace řetězců – 2 řetězce rodičovských DNA molekul jsou denaturovány při teplotě 94-96 °C po dobu 15 s (1. denaturace musí být většinou delší okolo 5 minut)
- 2) Nasednutí primerů (Annealing) – roztok je prudce ochlazen na 50-60 °C aby mohlo dojít k navázání primer na DNA řetězec; jeden primer nasedá k 3' konci cílové sekvence na jednom řetězci a druhý primer nasedá na 3' konec komplementárního řetězce
- 3) DNA syntéza (Extension) – roztok je zahřát na 72 °C, což je optimální teplota pro Taq DNA polymerázu. Polymeráza prodlužuje oba dva řetězce ve směru cílové sekvence rychlostí cca 1000 bp/1 min (DNA syntéza probíhá ve směru 5'-3'). Poslední syntéza vyžaduje delší časový úsek (Berg et al., 2002).



Obr. 5: Schematické znázornění teplotního profilu PCR cyklu (převzato z Kubista et al., 2006)

Tyto tři kroky představují jeden cyklus PCR amplifikace a mohou být prováděny opakovaně pouhou změnou teploty reakční směsi. Vzhledem k exponenciálnímu postupu amplifikace je po  $n$  cyklech teoreticky dosaženo  $2^n$  kopií. Prakticky je účinnost reakce předmětem plató efektu, tudíž se očekává, že počet molekul v určitém bodě přestane růst (Wassmuth, 2010).



Obr. 6: Schématické znázornění polymerázové řetězové reakce: 1) denaturací při 95 °C se rozruší DNA řetězce, 2) po ochlazení reakce na 55 °C dochází k nasednutí primerů, 3) Taq polymeráza syntetizuje komplementární řetězce (72 °C), 4) první cyklus je dokončen (převzato z [http://serc.carleton.edu/microbelife/research\\_methods/genomics/pcr.html](http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/genomics/pcr.html))

Účinnost amplifikace je závislá na navržení primeru, kvalitě a kvantitě templátové DNA, koncentraci draslíku a teplotě amplifikačního cyklu. V celé reakci je mnoho aspektů, kterým bychom měli věnovat velkou pozornost:

- Koncentrace templátové DNA – malý počet výchozích molekul může ovlivnit účinek amplifikace. Může vést k falešně-negativní nebo falešně-pozitivní amplifikaci.
- Inhibitory DNA polymerázy – přítomnost porfyrinů (produkt degradace hemu) a sodium dodecyl sulfát (SDS) v nízkých koncentracích a stejně tak dimethyl sulfoxid (DMSO) a formamid ve vysokých koncentracích snižují aktivitu DNA polymerázy. Podobně mohou škodit PCR malé částičky solí nebo chelatačních činidel.

- Navržení primeru – nedostatečná specifita, primerové artefakty (např. dimery primerů), nebo rozdíly v teplotě tání primerových párů mohou bránit procesu amplifikace.
- Koncentrace primeru – nadbytek primeru upřednostňuje nespecifickou amplifikační reakci, zatímco velmi malé množství primerů zeslabuje účinnost amplifikace.
- Termolabilita DNA polymerázy – stabilita a míra aktivity enzymu jsou závislé na teplotě. Při denaturační teplotě je poločas rozpadu zhruba 30 min (záleží na konkrétním enzymu). Optimální teplotní rozsah je 70 – 80 °C, tudíž dlouhá denaturační fáze a odchylka od optimální teploty během prodlužovací fáze snižují účinnost a míru syntézy.
- Parametry teplotního profilu PCR – krátké intervaly mezi jednotlivými kroky mohou snižovat účinnost amplifikace. Delší templáty potřebují více času k nasyntetizování DNA řetězce (prodlužující fáze: ~1 min/kb). Optimalizace teplotního profilu vyžaduje experimentální ověření a nemůže být založena jen na teoretickém předpokladu.
- Složení pufru – jelikož je aktivita DNA polymerázy závislá na přítomnosti hořčíku, jeho koncentrace (2-3 mM  $MgCl_2$ ) je jednou z nejdůležitějších složek PCR (Wassmuth, 2010).

Standardní PCR reakce může být modifikována tak, aby bylo možné do vznikajících oligonukleotidů inkorporovat značené nukleotidy. Běžně jsou využívány dvě metody značení:

- Standardní značení DNA založené na PCR – PCR reakce přizpůsobena k napojení jednoho nebo více nukleotidových prekurzorů po celé délce vzniklé DNA sekvence
- Primerem zprostředkované značení 5' konce – při PCR reakci má primer na svém 5' konci připojenou značenou skupinu, při pokračování PCR je značený primer inkorporován do PCR produktu. Tato metoda je často užívána s fluoroforovým značením (Strachan & Read, 1999).

Polymerázová řetězová reakce je základem pro mnoho dalších metod molekulární biologie pro typizaci HLA antigenu. V laboratořích se běžně používají tři metody, které zahrnují PCR-SSP, PCR-SSOP a PCR-SBT (Williams et al., 1999).

### 3.2.3 PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP)

PCR-SSP je výkonná, užitečná a praktická metoda pro detekci omezeného počtu cílových alel souvisejících s konkrétními onemocněními. Poskytuje nízké (low-resolution) až vysoké rozlišení HLA genů na alelické úrovni (high-resolution) (Woo et al., 2012).

Princip PCR-SSP spočívá v tom, že každá individuální alela, nebo skupina alel je amplifikována pomocí páru sekvenčně specifických primerů (Narouei-Nejad et al., 2003). Účinnost PCR závisí na přesném spárování koncového 3'-nukleotidu primerů s cílovou sekvencí DNA. Pouze cílová DNA sekvence zcela komplementární k oběma primerům je účinně amplifikovaná. Pokud se 3' konec přesně neshoduje, nedojde k nasednutí primeru a k aktivaci Taq DNA polymerázy (Welsh & Bunce, 1999). Taq polymeráza nemá 3'-5' exonukleázovou aktivitu (tzv. „proofreading“ aktivita), tudíž když alespoň jeden z primerů se nespáruje na 3' konci templátu (tzv. 3'-mismatch), nemůže dojít k žádným opravám a k amplifikaci. Tento princip umožňuje odhalení „single-nucleotide polymorphism“ (SNP). Amplifikované PCR produkty je možno detekovat na gelové elektroforéze (Wassmuth, 2010). Metodika SSP je rychlejší než metodika SSOP a nevyžaduje finančně nákladné laboratorní vybavení.

Modifikací klasické PCR-SSP je Nested PCR-SSP, kde jsou prováděny postupně dvě PCR amplifikace, kde druhý pár primerů je uvnitř cílové oblasti první PCR. V prvním reakci je genomová DNA amplifikována se sekvenčně specifickými primery pro alelovou skupinu a následně tento PCR produkt slouží jako templát pro sekvenčně specifické primery alelové podskupiny. Tato modifikovaná metoda může usnadnit detekci alel nebo skupin alel a používá se například při sekvenování HLA genů. Nicméně je tato metoda pracnější než běžná PCR-SSP (Wassmuth, 2010).

### 3.2.4 PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP)

PCR-SSOP je spolehlivá, snadná typizační metoda a vhodná pro typizaci velkého počtu vzorků, zejména pro typizaci dárců kostní dřeně (Williams et al., 1997a). Srovnáním metod PCR-SSP a PCR-SSOP zjistíme, že obě tyto metody mají své výhody, ale i nevýhody. Touto metodou je schopen jeden technik za 5 dní typizovat až 90 vzorků a na výsledky musíme čekat celých 5 dní. Kdežto PCR-SSP vyžaduje jeden den na 18 typizací a výsledky jednoho vzorku jsou zpracovány po 3-4 hodinách (Williams et al., 1997b).

Metoda je založená na detekci předdefinovaných nukleotidových sekvencí pomocí genových sond a na hybridizaci mezi sondou a cílovou komplementární sekvencí

(Wassmuth, 2010). V PCR-SSOP hybridizaci každá oligonukleotidová sonda hybridizuje s jednou nebo více alelami a hybridizační schéma celé skupiny sekvenčně specifických oligonukleotidových sond vede k identifikaci alel (Aldener-Cannavá & Olerup, 2001). Sondy jsou chemicky nasyntetizované jednořetězcové polymery nukleových kyselin. Většinou jsou 15-25 bazí dlouhé a nazývají se SSOP (sequence specific oligonukleotide probe). Při hybridizaci PCR fragmentů s oligonukleotidovou sondou, jsou nejprve tyto fragmenty denaturovány k získání jednořetězcové DNA a poté jsou fixovány na nosičovou matrix. Oligonukleotidové sondy jsou značeny ve většině případů neradioaktivním značením (nejčastěji enzymem) pro nepřímou detekci. Během hybridizace jsou jednořetězcová cílová sekvence a oligonukleotidová sonda společně inkubovány za podmínek, které podporují jejich navázání (hybridizace je reversibilní). Poté je komplex cílová sekvence-sonda nepřímo detekován enzymatickou reakcí. Při značení digoxigeninem je k detekci zapotřebí konjugátu alkalické fosfatázy a anti-digoxigeninové protilátky. Pozitivní komplexy jsou vizualizovány v barevných reakcích (např. OPD) nebo chemiluminiscencí (např. CSPD) (Wassmuth, 2010).

Při HLA genotypizaci je použito více rozdílných skupin oligonukleotidových sond, z důvodu rozdílných alelických sekvencí v polymorfní oblasti HLA genů. Čím větší je pokrytí alelických rozdílů specifickými oligonukleotidy, tím vyšší je rozlišovací schopnost. Pro genotypizaci HLA I. třídy pomocí PCR-SSOP jsou vyšetřovány exony 2 a 3 (v některých případech je požadován i exon 4), pro HLA geny II. třídy je nejčastěji vyšetřován exon 2.

Modifikací PCR-SSOP je reverzní PCR-rSSOP. U této metody jsou značené rovnou PCR fragmenty namísto oligonukleotidových sond. Během PCR amplifikace dojde k označení PCR fragmentu biotinem. Poté následuje denaturace značených PCR fragmentů na jednořetězcové DNA fragmenty. Tyto fragmenty se váží na oligonukleotidy, které jsou upevněné na membráně, či mikročástici. Hybridizované navázané PCR produkty jsou inkubovány s konjugátem alkalické fosfatázy a streptavidinu. Vizualizace se provádí enzymatickou přeměnou chromogenního substrátu. Obecně je dávána přednost reverzní SSOP metodě před klasickou SSOP metodou z důvodu vyšší výkonnosti a automatizace postupu (Wassmuth, 2010).

Obě metody PCR-SSOP i PCR-rSSOP jsou běžně používané HLA typizační metody, nicméně následující skutečnosti vyžadují pozornost při postupu (Wassmuth, 2010):

- Templátová DNA – PCR-SSOP je velmi citlivá metoda, tudíž nesmí dojít k žádné kontaminaci s ostatními DNA vzorky nebo PCR amplikony.
- PCR – nedostatečná účinnost amplifikace, nedostatek specifity amplifikace
- Oligonukleotidové sondy – nevyhovující značení, chyby v syntéze oligonukleotidů

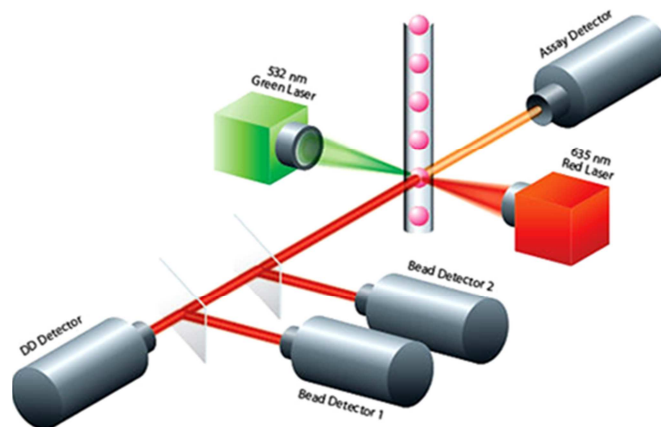
- Matrix (dot-blot) – malé množství PCR fragmetnů na matrix, nedostatečná denaturace PCR fragmetnu, nedostatečné odstranění hybridizovaných oligonukleotidů před rehybridizací s novými sondami
- Hybridizace – nesprávná teplota hybridizace, nevhodný pufr a hybridizační postup, falešně-negativní a falešně-pozitivní oligonukleotidové hybridizační reakce
- Detekce – nedostatečně značení oligonukleotidových sond, nízká účinnost či citlivost detekční reakce
- Interpretace – chybné hodnocení hybridizační reakce, shodná schémata reakce pro rozdílné alelické kombinace

### 3.2.5 Luminex

Další velmi užívanou metodou v rutinní HLA typizaci je technologie kombinující metodu PCR-SSOP s průtokovou cytometrií Luminex 100 xMAP s dvou-laserovým systémem (Itoh et al., 2005). Luminex využívá fluorescenčně značené polystyrenové mikrosféry, které slouží jako nosiče pro oligonukleotidové sondy. V rámci jednoho vzorku lze identifikovat 100 různých genů či proteinů (Bruchová et al., 2005).

Jak už jsem zmínila, jako nosiče sond zde slouží polystyrenové mikrosféry o průměru 5,6  $\mu\text{m}$ . Oligonukleotidové sondy jsou na povrchu mikrosfér ukotveny kovalentní vazbou a na 5' konci jsou značeny biotinem. V Luminex systému je k dispozici sto setů různě fluorescenčně značených mikrosfér (díky smíchání různých poměrů dvou fluorescenčních barev s emisní vlnovou délkou 560-590 nm), každý set mikrosfér má charakteristickou fluorescenci a při průchodu lasery je tak identifikován. Mikrosféry s navázaným vzorkem protékají detekčním kanálem a fluorescence je snímána pomocí dvou laserových paprsků (Bruchová et al., 2005). První laser vybudí fluorescenci z vnitřní části mikrosféry k její identifikaci a druhý laser vybudí fluorescenci na povrchu, tj. na navázaných vzorcích. Nakonec jsou barevné signály zachyceny moderním optickým systémem (Heinemann, 2009). Výsledná hodnota fluorescence je kalkulována jako průměrná hodnota všech měření v setu (Bruchová et al., 2005).

Hlavní předností Luminexu je robustnost metody a možnost testování velkého počtu genů nebo jejich variant (alel). Je velmi přesná a flexibilní, umožňuje vybrat pouze určité sety mikrosfér (Bruchová et al., 2005).

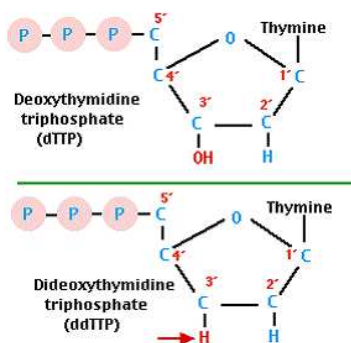


Obr. 7: Mikrosféry procházející detekčním prostorem (převzato z <http://www.viracor.com/Learning-Lab/Luminex>)

### 3.2.6 Sekvenování HLA genů (sequencing-based typing, SBT)

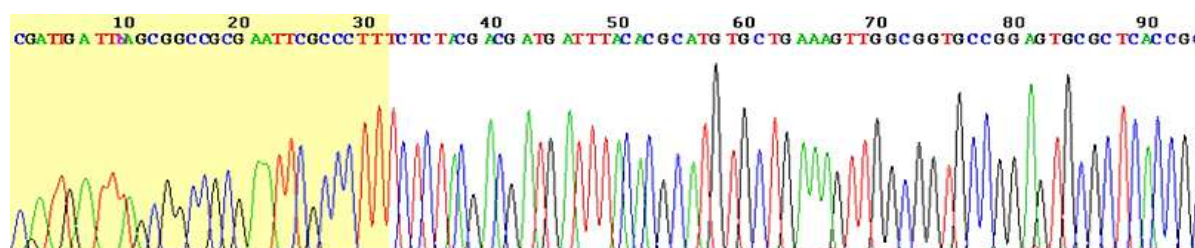
Sequencing-based typing metoda je založena na automatizovaném skenování PCR amplifikačních produktů a umožňuje sekvenování HLA regionů (Mytilineos, 1996). Varianty SBT metody se liší s ohledem na výchozí materiál (DNA, RNA, cDNA), amplifikační strategii, strategii sekvenování, barvení a stupni automatizace (Wassmuth, 2010).

Klasická metodika sekvenování (SBT) která se používá pro HLA genotypizaci je založená na metodě terminace řetězce (Sangerova metoda). Využívá DNA polymerázu, která umožňuje použití inhibitorů k ukončení nově nasyntetizovaných řetězců. Jako inhibitory jsou zde používány dideoxynukleotidy (ddNTP), modifikované deoxynukleotidy (dNTP), které mají na 3' uhlíku samotné vodíky namísto -OH skupiny (viz Obr. 8) (Sanger et al., 1977). Sangerova metoda sekvenování využívá skutečnosti, že DNA polymeráza umí iniciovat DNA syntézu na 3' konci primeru hybridizovaného s DNA a ddNTPs, které jsou přidány v malé koncentraci do reakční směsi DNA polymerázové reakce, náhodně ukončí růst oligonukleotidového řetězce (Arens, 2001).



Obr. 8: Deoxytymidin trifosfát (dTTP) a dideoxytymidin trifosfát (ddTTP) s vyznačeným navázaným vodíkem místo -OH skupiny na 3'C (převzato z [http://e-dok.rm.dk/e-dok/e\\_7026MoMe.NSF/0/C83765824ED33C8CC1257682002EA6F1](http://e-dok.rm.dk/e-dok/e_7026MoMe.NSF/0/C83765824ED33C8CC1257682002EA6F1))

Postup se skládá z PCR amplifikační reakce a poté samotné sekvenační reakce. Nejprve si tedy amplifikujeme pomocí PCR reakce DNA úsek určený pro sekvenování. Následně je produkt PCR přečištěn k odstranění zbývajících primerů a uskuteční se sekvenační reakce s použitím Taq-polymerázy a fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (jedna fluorescenční barva odpovídá konkrétnímu dideoxynukleotidu). Vzniklé fragmenty jsou přečištěny, denaturovány a jednořetězcové produkty jsou odděleny kapilární elektroforézou s použitím automatizovaného systému. Výsledný elektroforeogram (viz Obr. 9) je zpracován softwarovou analýzou, která stanoví nukleotidovou sekvenci (Wassmuth, 2010).



Obr. 9: Elektroforeogram (převzato z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD\\_DNA](http://cs.wikipedia.org/wiki/Sekvenov%C3%A1n%C3%AD_DNA))

Přímé sekvenování HLA I. a II. třídy je stále více používáno a tato metoda byla obecně přijata jako high-resolution typizace. Je také využívána jako doplňující analýza při nejasnostech a nejednoznačnosti výsledků. SBT metoda, i přes cenovou náročnost, je při odhalování nových alel jedinečnou a nezastupitelnou metodou. Pomocí high-resolution SBT jsou analyzovány HLA systémy také v rozdílných etnických skupinách s cílem pochopit původ a rozmanitost v rámci celé populace (Ivanova et al., 2002).

V posledních letech se vyvíjí mnoho nových technik sekvenování, tzv. next-generation sequencing (NGS). Některé z metod NGS používají platformy firem Roche GS FLX, Illumina HiSeq, Life Technologies SOLiD a další. NGS je velmi rychle se rozvíjející oblast, kde se setkávají různé konkurenční technologie a nebude trvat dlouho, než se tyto technologie prosadí v HLA sekvenování (Dunn, 2011).



## 4 Závěr

Tato práce shrnuje základní poznatky o histokompatibilním systému, který je u člověka nazývaný HLA (Human leukocyte antigens) a dále popisuje nejvíce používané metody molekulární biologie v určování HLA polymorfismu.

HLA systém je velmi polymorfní genový úsek, který obsahuje více než 200 genů. Rozděluje se na tři regiony, z nichž dva se účastní regulace imunitní odpovědi (HLA I. a II. třídy). Zbývajících III. histokompatibilní region ležící uprostřed obsahuje geny komplementu a mimo jiné faktor nekrotizující nádory (TNF). Celý komplex se také uvádí ve spojení s některými autoimunitními a infekčními nemocemi.

Pomocí metod molekulární biologie se určuje míra polymorfismu HLA antigenu. V minulosti se k tomuto účelu používala sérologie a to s použitím komplementu, který lyzoval lymfocyty s určitým antigenem, na kterém je navázána specifická protilátka. Jelikož mnoho studií prokázalo, že molekulární techniky jsou lepší v mnoha ohledech, sérologie jimi byla nahrazena, viz např. Woszczek et al., 1997, Mishra et al., 2004, Adib et al., 2004, Nakatsugawa et al., 2011. Mezi nejvíce používané metody patří PCR se sekvenčně specifickými primery (PCR-SSP), které amplifikují individuální alely (nebo skupiny alel). Další podobnou metodou je PCR se sekvenčně specifickými oligonukleotidovými sondami (PCR-SSOP). Při této metodě dochází k hybridizaci značené genové sondy s cílovou sekvencí DNA na matrix. Poslední popisovanou metodou je sekvenování, které je založené na Sangerově metodě, pomocí značených dideoxynukleotidů dojde k terminaci syntetizovaného řetězce. Poté pomocí kapilární elektroforézy a automatizované analýzy získáme výsledný elektroforeogram, který stanoví hledanou nukleotidovou sekvenci.

PCR-SSP je oproti PCR-SSOP rychlejší a zajišťuje nám jak nízké rozlišení, tak i vysoké rozlišení (high-resolution) HLA genů. Pomocí metody PCR-SSOP můžeme testovat velké množství vzorků. Nesmím opomenout velmi jednoduchou a přesnou modifikovanou metodu PCR-SSOP, Luminex, která nám umožňuje testovat velké množství genů a je velmi flexibilní. Sekvenování (SBT) je velmi cenově náročnou metodou, ale i přesto je nezastupitelnou a jedinečnou metodou HLA typizace.

## 5 Literatura

- Adib, M., Yaran, M., Solgi, G., & Rezaie, A. (2004). HLA-DR Typing by Polymerase Chain Reaction with Sequence- Specific Primers Compared to Serological typing. *Journal of Research in Medical Sciences*, 9(6), 255-259.
- Aldener-Cannavá, A., & Olerup, O. (2001). HLA-DPB1 typing by polymerase chain reaction amplification with sequence-specific primers. *Tissue Antigens*, 57(4), 287-299.
- Arens, M. (2001). Clinically relevant sequence-based genotyping of HBV, HCV, CMV, and HIV. *Journal of clinical virology the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 22(1), 11-29.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). 6.1.5. Selected DNA sequence can be greatly amplified by the polymerase chain reaction. *Biochemistry* (5th ed., p. 894). New York: W H Freeman.
- Bruchová, H., Kráčmarová, A., Černý, V., & Brdička, R. (2005). Využití technologie LabMAP Luminex pro detekci SNP polymorfismů. *Klinická biochemie a metabolismus*, 13(2), 87-91.
- Caillat-Zucman, S. (2009). Molecular mechanisms of HLA association with autoimmune diseases. *Tissue Antigens*, 73(1), 1-8.
- Choo, S. Y. (2007). The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 41(8), 11-23
- Clements, C. S., Kjer-Nielsen, L., Kostenko, L., Hoare, H. L., Dunstone, M. A., Moses, E., Freed, K., et al. (2005). Crystal structure of HLA-G: A nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), 3360-3365.
- Deakin, J. E., Papenfuss, A. T., Belov, K., Cross, J. G., Coghill, P., Palmer, S., Sims, S., et al. (2006). Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region. *BMC Genomics*, 7, 281.
- Dunn, P. P. J. (2011). Human leucocyte antigen typing: techniques and technology, a critical appraisal. *International journal of immunogenetics*, 38(6), 463-73.
- Favier, B., LeMaout, J., Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., & Carosella, E. D. (2007). Research on HLA-G: an update. *Tissue antigens*, 69(3), 207-11.

- Germain, R. N. (1995). The Biochemistry and Cell Biology of Antigen Presentation by MHC Class I and Class II Molecules. *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, 754(1), 114–125.
- Heinemann, F. M. (2009). HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex™ Multiplex Technology. *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie*, 36(4), 273-278.
- Hoelsch, K., Lenggeler, I., Pfannes, W., Knabe, H., Klein, H.-G., & Woelpl, A. (2005). Routine HLA-B genotyping with PCR-sequence-specific oligonucleotides detects a B\*52 variant (B\*5206). *Tissue Antigens*, 65(5), 488-492.
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (1990). 1. Optimization of PCRs. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (p. 482). Academic Press.
- Itoh, Y., Mizuki, N., Shimada, T., Azuma, F., Itakura, M., Kashiwase, K., Kikkawa, E., et al. (2005). High-throughput DNA typing of HLA-A, -B, -C, and -DRB1 loci by a PCR-SSOP-Luminex method in the Japanese population. *Immunogenetics*, 57(10), 717-29.
- Ivanova, M., Rozemuller, E., Tyufekchiev, N., Michailova, A., Tilanus, M., & Naumova, E. (2002). HLA polymorphism in Bulgarians defined by high-resolution typing methods in comparison with other populations. *Tissue Antigens*, 60(6), 496-504.
- Klein, C., Lisowska-Grospierre, B., LeDeist, F., Fischer, A., & Griscelli, C. (1993). Major histocompatibility complex class II deficiency: clinical manifestations, immunologic features, and outcome. *The Journal of pediatrics*, 123(6), 921-928.
- Klein, J., & Sato, A. (2000). The HLA system. Second of two parts. *The New England Journal of Medicine*, 343(11), 782-786.
- Klein, Jan, & Sato, A. (2000). Advances in immunology - The HLA system - First of two parts. *New England Journal of Medicine*, 343(10), 702-709.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., et al. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine*, 27(2-3), 95-125.
- Lepin, E. J. M., Bastin, J. M., Allan, D. S. J., Roncador, G., Braud, V. M., Mason, D. Y., Merwe, P. A. van der, et al. (2000). Functional characterization of HLA-F and binding of

- HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *European Journal of Immunology*, 30(12), 3552-3561.
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Fernández-Viña, M., et al. (2010). An update to HLA nomenclature, 2010. *Bone Marrow Transplantation*, 45(5), 846-848.
- Middelton, D. (2005). HLA Typing from Serology to Sequencing Era. *Iranian journal of allergy asthma and immunology*, 4(2), 53-66.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- Mishra, M. N., Mani, H., Narula, A. S., & Saxena, V. K. (2004). HLA Typing – A Comparison of Serology and DNA Techniques. *Society*, 4(2), 151-153.
- Mytilineos, J. (1996). HLA testing: the state of the art of genomic methods in 1996. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 11(11), 2129-2134
- Nakatsugawa, M., Hirohashi, Y., Torigoe, T., Inoda, S., Kiriya, K., Tamura, Y., Sato, E., et al. (2011). Comparison of speedy PCR-ssp method and serological typing of HLA-A24 for Japanese cancer patients. *Journal of immunoassay immunochemistry*, 32(2), 93-102.
- Narouei-Nejad, M., Khosravi, F., Danesh, A., & Nikbin, B. (2003). Polymerase chain reaction-sequence specific primer (PCR-SSP) versus serology in typing HLA-A, -B and -C in Iranian patients. *Archives of Iranian Medicine*, 6(1), 23-28.
- Qiagen. (2010). *QIAamp ® DNA Mini and Blood Mini Handbook* (3rd ed., p. 72). QIAGEN.
- Robinson, J., Waller, M. J., Parham, P., De Groot, N., Bontrop, R., Kennedy, L. J., Stoeckl, P., et al. (2003). IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex. *Nucleic Acids Research*, 31(1), 311-314.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-7.
- Strachan, T., & Read, A. P. (1999). 6.1. Basic features of PCR. *Human Molecular Genetics* (2nd ed., p. 576). New York: Wiley-Liss.

- Tiercy, J. M. (2002). Molecular basis of HLA polymorphism: implications in clinical transplantation. *Transplant Immunology*, 9(2-4), 173-180.
- Trivedi, V. B., Dave, A. P., Dave, J. M., & Patel, B. C. (2007). Human leukocyte antigen and its role in transplantation biology. *Transplantation Proceedings*, 39(3), 688-693.
- Vandiedonck, C., & Knight, J. C. (2009). The human Major Histocompatibility Complex as a paradigm in genomics research. *Briefings in functional genomics proteomics*, 8(5), 379-394.
- Vaughan, R. W., & Hospital, G. (2001). Tissue Typing for Transplantation Antigens. *Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Veiga-Castelli, L. C., Castelli, E. C., Mendes, C. T., da Silva, W. A., Faucher, M.-C., Beauchemin, K., Roger, M., et al. (2012). Non-classical HLA-E gene variability in Brazilians: a nearly invariable locus surrounded by the most variable genes in the human genome. *Tissue antigens*, 79(1), 15-24.
- Wassmuth, R. (2010). *Primer on the HLA System. Basic Concepts - Medical- Rlevance - Laboratory Methods - Quality Management* (p. 118). Landsberg: ecomed MEDIZIN, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm.
- Welsh, K., & Bunce, M. (1999). Molecular typing for the MHC with PCR-SSP. *Reviews in Immunogenetics*, 1(2), 157-176.
- Williams, F., Mallon, E., & Middleton, D. (1997). Development of PCR-SSOP for HLA-A typing of bone marrow registry donors. *Tissue Antigens*, 49(1), 61-66.
- Williams, F., Mawhinney, H., & Middleton, D. (1997). Application of an HLA-B PCR-SSOP typing method to a bone marrow donor registry. *Bone Marrow Transplantation*, 19(3), 205-208.
- Williams, F., Meenagh, A., Maxwell, A. P., & Middleton, D. (1999). Allele resolution of HLA-A using oligonucleotide probes in a two-stage typing strategy. *Tissue Antigens*, 54(1), 59-68.
- Woo, H. I., Joo, E. Y., Hong, S. B., Lee, K. W., & Kang, E.-S. (2012). Use of PCR with sequence-specific primers for high-resolution human leukocyte antigen typing of patients with narcolepsy. *Annals of laboratory medicine*, 32(1), 57-65.

- Woszczek, G., Borowiec, M., Miś, M., Górską, M., & Kowalski, M. L. (1997). Comparison of serological and molecular (PCR-SSP) techniques of HLA-DR typing in clinical laboratory routine. *Annals of transplantation quarterly of the Polish Transplantation Society*, 2(1), 39-42.
- Xie, T., Rowen, L., Aguado, B., Ahearn, M. E., Madan, A., Qin, S., Campbell, R. D., et al. (2003). Analysis of the Gene-Dense Major Histocompatibility Complex Class III Region and Its Comparison to Mouse. *Genome Research*, 13(12), 2621-2636.
- Yuhki, N., Beck, T., Stephens, R., Neelam, B., & O'Brien, S. J. (2007). Comparative genomic structure of human, dog, and cat MHC: HLA, DLA, and FLA. *The Journal of heredity*, 98(5), 390-9.